

JP5336982

Publication number: JP5336982
Publication date: 1993-12-21
Inventor: MOCHIDA KOICHI; KONDO YOSHIKAZU; MATSUI MASAO; ICHIHASHI KUNIO
Applicant: KANEBO LTD
Classification:
- international: C12P7/62; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/62; C12P7/62
- european:
Application number: JP19920353197 19921211
Priority number(s): WO1992JP00751 19920611

Report a data error here

Abstract of JP5336982

PURPOSE:To safely and efficiently obtain the subject biodegradable polymer by adding a lytic enzyme to a suspension of a microbial cell containing an accumulated polyhydroxy organic acid ester, dissolving the cell wall, then separating grains of the accumulated substance covered with a film in the cytoplasm and removing the film with an enzyme. **CONSTITUTION:**A microorganism [e.g. *Rhodobacter.capsulatus* (ATCC11166)] capable of producing a polyhydroxy organic acid ester is cultured in a culture medium and the resultant microbial cell containing the accumulated polyhydroxy organic acid ester is then suspended in a 0.50mM phosphoric acid buffer solution at pH 7.0. A lytic enzyme such as lysozyme is added and made to react therewith at ambient temperature for 30min to dissolve the cell wall. The obtained suspension is subsequently centrifuged to recover grains of the polyhydroxy organic acid ester, present in the cytoplasm, covered with a granular film and having $\geq 0.1\mu\text{m}$ grain diameter. The grain film is then dissolved and removed by treatment with a proteolytic enzyme such as trypsin and the reactional solution is centrifuged to recover a precipitate. Thereby, the objective high-purity polyhydroxy organic acid ester is safely and efficiently separated.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-336982

(43)公開日 平成5年(1993)12月21日

(51)Int.Cl.⁵

C12P 7/62

識別記号

庁内整理番号

F1

技術表示箇所

9282-4B

審査請求 未請求 請求項の数1(全7頁)

(21)出願番号	特願平4-353197	(71)出願人	000000952 鐘紡株式会社 東京都墨田区墨田五丁目17番4号
(22)出願日	平成4年(1992)12月11日	(72)発明者	持田 晃一 京都市左京区下鴨森本町15番地 財団法人 生産開発科学研究所内
(31)優先権主張番号	PCT/JP92/00751	(72)発明者	近藤 義和 山口県防府市国衛二丁目5番31号
(32)優先日	1992年6月11日	(72)発明者	松井 雅男 大阪府高槻市北園町7番18号
(33)優先権主張国	米国(US)	(72)発明者	市橋 邦夫 大阪府枚方市長尾西町三丁目7番2号
		(74)代理人	弁理士 朝日奈 宗太 (外2名)

(54)【発明の名称】 ポリヒドロキシ有機酸エステルの分離・精製法

(57)【要約】

【構成】 ポリヒドロキシ有機酸エステル蓄積菌体からポリヒドロキシ有機酸エステルを分離・精製する方法であって、菌体懸濁液へ溶菌酵素を添加して細胞壁を溶解する工程ののち、細胞質中に存在する顆粒皮膜で覆われた粒径0.1 μ m以上のポリヒドロキシ有機酸エステル顆粒について、これを分離回収して集める工程と、しかるのちに蛋白分解酵素処理によって顆粒皮膜を除去する工程とからなることを特徴とするポリヒドロキシ有機酸エステルの分離・精製法である。

【効果】 本発明の分離・精製法により、PHA蓄積菌から、安全に効率よく、純度の高いPHAを分離・精製することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリヒドロキシ有機酸エステル蓄積菌体からポリヒドロキシ有機酸エステルを分離・精製する方法であって、菌体懸濁液へ溶菌酵素を添加して細胞壁を溶解する工程ののち、細胞質中に存在する顆粒皮膜で覆われた粒径0.1 μm以上のポリヒドロキシ有機酸エステル顆粒について、これを分離回収して集める工程と、しかるのちに蛋白分解酵素処理によって顆粒皮膜を除去する工程とからなることを特徴とするポリヒドロキシ有機酸エステルの分離・精製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、菌体内に蓄積されたポリヒドロキシ有機酸エステル（以下、PHAという）を分離・精製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】PHAは、細菌のエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積される高分子であることが知られている。PHAは自然分解性を有するポリマーであることから、環境保護の問題が注目される昨今、大いにその利用、応用が期待されている。しかしながら、その分離・精製が問題であった。

【0003】従来、菌体内PHAの分離・精製は、クロロホルム、ジクロルエタンなどといった塩素系有機溶媒を用いて行なわれていた（たとえば、特開昭61-35790号公報参照）。しかし、抽出に必要とされる溶剂量がきわめて大量であるばかりでなく、抽出した溶液の粘度も非常に大きく該溶液からのポリマーの分離・精製が困難である。さらに、毒性および環境に対する影響に鑑みれば、このような有機溶媒を多量に用いる方法は好ましくない。実際に、これらの有機溶媒の使用は漸次、法的に規制される方向である。

【0004】また、塩素系以外の有機溶媒であるジオキサンを用いた方法もあるが（特開昭63-198991号公報参照）、ポリマーの溶解性の点で、ジオキサン溶液の温度を80度以上という高温にしなければならず、作業性の点やPHAが分解・劣化するなど実用性に欠けるものである。

【0005】有機溶媒を用いない方法としては、特開昭60-145097号公報に記載の方法があげられる。これは、PHA含有菌体を蛋白分解酵素および／または界面活性剤で可溶化したのちにPHAを含む不溶性残留物を分離する方法である。このような方法では、蛋白分解酵素および／または界面活性剤により非選択的に細胞膜や蛋白質が可溶化されPHA含有液の粘度が著しく高くなる。そのため、溶液からのPHA顆粒の分離・回収操作が困難になり、不純物除去のための濾過、遠心分離などの分離・回収操作も不可能となる。また、分離・精製操作中にPHAが細胞質および蛋白質酵素加水分解物と混在し、安定な懸濁液となるため、遠心分離によってPHA

を集めるためには凝集剤を添加してフロックを形成させなくてはならない。これにより凝集剤添加という工程が増えるだけでなく、フロック中にはPHA以外の成分が含まれることになるため、製造コストの面でもPHAの純度の面でも不都合である。

【0006】特開昭63-226291号公報には、菌体をスフェロプラストへ変換し、音波振動処理によってこれらを破碎し、そして遠心分離したのちに形成される最上層（PHA）を分離する方法が記載されている。この方法では、音波振動処理によりPHA含有液の粘度はやはり著しく上昇する。また、浮上したPHAを分離するため、PHAと同比重である不純物を除去することができない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明はかかる実情に鑑み、これまでのような有害な有機溶媒を用いず、かつPHA含有液の大幅な粘度アップを抑え、また凝集剤の添加のような余分の工程も不要な純度の高いPHAの分離・精製法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明はPHA蓄積菌体からPHAを分離・精製する方法であって、菌体懸濁液へ溶菌酵素を添加して細胞壁を溶解する工程ののち、細胞質中に存在する顆粒皮膜で覆われた粒径0.1 μm以上のPHA顆粒について、これを分離回収して集める工程と、しかるのちに蛋白分解酵素処理によって顆粒皮膜を除去する工程とからなることを特徴とするPHAの分離・精製法に関する。

【0009】

【実施例】本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、溶菌酵素を用いることによりPHA顆粒膜を損なうことなく細胞壁のみを溶解することで、PHAを顆粒として他の細胞成分より容易に分離しうることを、さらにPHA顆粒から容易に膜成分を除去しうることを見出し、本発明を完成した。

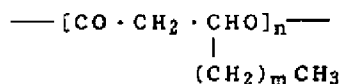
【0010】つぎに本発明のPHA分離・精製法について説明する。

【0011】本発明において用いられるPHA蓄積菌体は、ロドバクター（*Rhodobacter*）属、アルカリゲネス（*Alcaligenes*）属またはバチルス（*Bacillus*）属に属する微生物、その他PHAを菌体内に蓄積する微生物であればいずれの菌体でもよい。ここで、PHAとは、以下の式(I)で示される、菌体内に蓄積されるポリマーまたはコポリマーである。

式(I)：

【0012】

【化1】

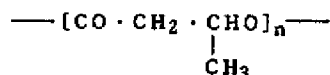


(式中、mおよびnは整数を表わす) そのようなPHAとしては、たとえば下記の式(II)で示されるポリ-3-ヒドロキシ酪酸エステル(以下、PHBという)よりなるポリマーまたはPHBよりなるポリマーが主成分となるポリマーがあげられる。

式(II):

【0013】

【化2】



(式中、nは前記と同じ) そのばあいには、他の成分として、炭素数5以上の有機酸エステル成分も含まれてもよい。さらに、3-ヒドロキシ酪酸エステル、3-ヒドロキシ吉草酸エステルよりなるポリマーがあげられる。

【0014】このようなPHAを菌体内に蓄積する微生物では、PHAは顆粒として顆粒膜に包まれて菌体内に存在する。PHA顆粒膜は、PHA合成酵素およびPHA分解酵素などの蛋白質と微量のリン脂質からなるもので、菌体内でPHAを細胞質から隔離し、顆粒を安定な形状に保つ働きをしている。

【0015】菌体中のPHA顆粒の粒径は0.1 μm以上であればよい。粒径が0.1 μm未満のばあいには分離・回収が格段に困難になりかつ0.1 μm以下の分率が相対的に少なく、0.1 μm以下のPHA顆粒を除外したとしても実用上は問題ない。分離操作を行なう前に、検鏡により0.1 μm以上であることを確認する。微生物体内に蓄積するPHA顆粒の大きさは、上述のように0.1 μm以上が好ましく、0.1 μm未満の顆粒は分離精製過程において排除される可能性がある。

【0016】また、菌体中のPHA蓄積量も限定されないが、本発明の方法は菌体中のPHA蓄積量が高いばあいにとくに有効であり、好ましくは80重量%以上である。

【0017】本発明において用いられる溶菌酵素は、細胞壁を消化するが、顆粒膜を消化しないものならば何でもよい。そのような酵素としては、たとえばリゾチームがあげられる。

【0018】まず、前記菌体を懸濁した水性溶液に、溶菌酵素を0.1 ~ 0.5 mg/ml添加して室温、約pH6 ~ 8.5にて10 ~ 60分程度消化を行なう。

【0019】溶菌酵素処理によりえられたPHA顆粒を含有する液から、PHA顆粒を分離回収する。PHA顆粒の分離は、遠心分離、濾過、電気泳動などによって行なうことができる。工業的規模で行なうばあいには、遠心分離または濾過が好ましい。

【0020】遠心分離によってPHA顆粒を分離するばあいには、遠心分離は約9,000 ~ 12,000G (G: 重力加速度) で2 ~ 15分間程度行なうのが好ましいが、PHA顆粒の形状および大きさなどにより適宜決定されるべき

である。

【0021】濾過によってPHA顆粒を分離するばあいには、通常使用される精密濾過膜や限外濾過膜を使用できる。たとえば、ポリエチレンやポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリカーボネートなどのフィルム、メンブレンに特定の孔を形成させたものがあげられる。該濾過膜の孔の大きさは、通常少なくとも0.05 μm以上である。遠心分離と濾過とを組み合わせることによっても効率的、あるいは高精度で達成できる。

10 【0022】そのようなして分離されたPHA顆粒を蛋白分解酵素処理することにより、PHA顆粒膜を溶解除去する。すなわち、PHA顆粒をpH6 ~ 8の10 ~ 100 μMトリス-HCl緩衝液またはリン酸緩衝液中に再懸濁し、蛋白分解酵素を100 ~ 1000 μg/ml添加して30 ~ 40℃にて30 ~ 60分間反応させることにより行なう。

【0023】用いられる蛋白分解酵素はとくに限定されないが、たとえばプロナーゼ、ナガーゼ、ヒオブラーゼ、パバイン、トリプシンなどがあげられる。

20 【0024】蛋白分解酵素処理後、再び遠心などによりPHAを分離する。必要に応じて反応後に水で洗浄を行なう。

【0025】PHA顆粒膜の溶解除去は、前記のように顆粒を分散した溶液から行なうことも可能であるが、PHA顆粒を直接溶解、成形したのちに行なうこともできる。成形条件としては、PHAの分解温度以下に行なうことが必須である。好ましくは、分解点以下にて圧力をかけて焼結体を形成することが好ましい。成形後に処理することにより、処理中に顆粒が壊れずにPHAが回収しやすいなどの工業的メリットがある。また、蛋白分解酵素処理が容易に行なわれるように、成型はフィルム、シート、集積体または糸状などのできるだけ表面積が大きくなるような形に行なう。そうすることにより、溶解処理面積増大にともなう処理時間の低減が図られる。このように成形されたPHA顆粒をそのまま、または細断して蛋白分解酵素を溶解した緩衝液に加え、前記と同様にして反応せしめ、蛋白質を溶解除去する。

30 【0026】または、菌体を溶菌酵素処理したのち、前記のように蛋白分解酵素処理を先に行なってから、前記の分離操作によりPHAを分離することも可能である。蛋白分解酵素処理を適切に行なうことによりPHA顆粒は膜が溶解されたのちも顆粒状を保ち、その後につづく分離操作は容易に行なうことができる。

【0027】なお、本発明の分離・精製法においては必要に応じて、溶菌処理の際に核酸分解処理を行なってもよい。核酸分解処理は、たとえば小ウシのパンクレアス由来デオキシリボヌクレアーゼI (400 ~ 600 U/mg) などの核酸分解酵素を加えることにより行なわれる。

【0028】また、本発明の分離・精製法においては必要に応じて、溶菌処理後に超音波処理および10KHz程度の可聴音波を使用した音波処理を行なうこともでき

る。このばあいの超音波処理および10KHz程度の可聴音波を使用した音波処理条件としては、PHA顆粒自体が分解しない程度の処理を行なう。また、必要に応じてPHA分散液を冷却する。菌の種類により、処理条件は当然変わってくるが、10KHz以上1000KHz程度の音波あるいは超音波を使用する。これらの周波数は微生物の種類によっても変えることは任意である。強度は、通常 $0.05\text{W}/\text{cm}^2$ 以上好ましくは、 $0.1 \sim 50\text{W}/\text{cm}^2$ 、さらに好ましくは $1 \sim 30\text{W}/\text{cm}^2$ 程度である。ただし、菌体の超音波処理に通常用いられる超音波強度($1\text{W}/\text{cm}^2$ 程度)よりかなり強い強度($10 \sim 30\text{W}/\text{cm}^2$ 程度)の超音波を用いて処理しても、菌体中のPHA顆粒は破壊されない。一方、その他の菌体成分は速やかに微細化される(本発明の方法にしたがってリゾチームで処理されたのちのロドバクター キャプスレイタスのばあい、20KHz、 $20\text{W}/\text{cm}^2$ 、5分の超音波処理により菌体は微細化された)。したがって、超音波の強度が強いほど処理が短時間で済み、効率的である。

【0029】以上のような方法により精製されたPHAがえられる。

【0030】つぎに本発明のPHAの分離・精製法を実施例に基づいて説明するが、本発明はもとよりかかる実施例のみに限定されるものではない。

実施例1

ロドバクター キャプスレイタス(Rhodobacter capsulatus ATCC 11166)(グルコースを炭素源としたときに主としてPHBからなるPHAを蓄積することが知られる)をグルコースを炭素源として培養したPHA蓄積菌体(菌体1個あたり粒径 $0.4 \sim 0.6\mu\text{m}$ の顆粒が2~3個入っているのが観察された)5g(湿菌、乾燥菌体1gに相当)をpH7.0、50mMリン酸緩衝液30mlに懸濁し、リゾチーム(塩化リゾチーム(精製)卵白由来、ナカライテスク社製)50mg、 1M CaCl_2 、0.5ml、デオキシリボヌクレアーゼ(シグマ製、タイプI)を0.5mg加えて攪拌し、室温で30分間反応させた。ついで、氷冷下超音波処理を20KHz、10分間行なった。つぎに遠心分離を10,000Gで30分間行なってPHA粒子画分を集めた。再度、PHA画分をpH8.0、50mMリン酸緩衝液へ懸濁し遠心分離してPHA画分を集めて精製を繰返し、粗PHA(純度75%)0.52gをえた。粗PHAを 150°C で溶解し厚さ $50\mu\text{m}$ のフィルムに成形した。このフィルムを約 $1 \times 1\text{mm}$ に碎断し、pH7.0、50mMリン酸緩衝液に浸漬し、ブローナーゼ20mgを加え、 80°C 、6時間反応させた。反応後フィルムを水洗し乾燥した(0.8g)。

実施例2

実施例1でえたロドバクター キャプスレイタス(R. capsulatus ATCC 11166)の凍結乾燥菌体100mg(PHA含有量80%)を50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)100mlへ懸濁し、5分間ゆるやかに攪拌し

た。検鏡の結果、菌体内PHA顆粒の直径は $0.4 \sim 0.8\mu\text{m}$ で1または2個が1菌体内に存在するのがわかった。ついで 1M MgCl_2 、1ml、リゾチーム(塩化リゾチーム(精製)卵白由来、ナカライテスク社製)50mg、DNAアーゼ(シグマ製、タイプI)1mgおよび 0.1M EDTA ナトリウム2mlを加えて攪拌して溶かした。30分間攪拌後、容器を碎氷中へ移し、10KHzで2分間処理した。遠心管へ移し、5000G20分の条件で遠心分離し、上清をすて、50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)10mlを加えて粗PHA懸濁液をえた。同条件で遠心分離して上清をすてたのち、0.01%トリブシンを含むトリス塩酸緩衝液3mlを加えて、 30°C 、10分間攪拌してPHA顆粒膜蛋白質を溶解した。これを5000Gで10分間遠心分離して上清をすて、沈降したPHAへ同緩衝液10mlを加えて攪拌後5000G、10分間の条件で遠心分離した。上清をすて沈降したPHAを凍結乾燥した。収量は75mgであった。

実施例3

実施例1により製造したPHAの性状を確認するために、熱分析(DSC)、分子量分布測定(GPC)および核磁気共鳴スペクトルの測定(NMR)を行なった。

【0031】以下にその条件と結果を示す。

(1) GPC

(検液) 試料約30mgにm-クレゾールを10ml加え 40°C にて完全に溶解したのち、 CHCl_3 で50mlにメスアップし、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過したものを検液とした。

【0032】(測定条件)

ポンプ: CCPD(東ソー)

30 カラム: GMHXL(東ソー)

溶離液: m-クレゾール/ CHCl_3 (1:4)

流量: $1.0\text{ml}/\text{min}$

温度: 40° (恒温槽CO-8011東ソー)

Det.: RI-8010(東ソー)

注入量: $50\mu\text{l}$

(分子量校正曲線) 標準ポリスチレンより作成し、分子量は標準ポリスチレン分子量の換算値表をす。

【0033】(データ) 分子量分布曲線を図1に示す。

【0034】(結果) データより実施例1のPHAのMwは180万、Mnは80万であることがわかった。Mw/Mnは2.25であった。

(2) DSC

測定結果を図2に示す。

【0035】この結果から、実施例1のPHAのTmは 165.2°C であることがわかった。

(3) NMR

磁場を300MHzとして、溶媒は重水素化クロロホルムを用いてNMRを行なった。

【0036】実施例1でえられたPHAについての ^1H -NMRの測定結果を図3に、 ^{13}C -NMRの測定結果

を図4に示した。

【0037】NMRの結果より、実施例1でえたPHAはヒドロキシ酪酸(PHB)、ヒドロキシ吉草酸(PHV)単位を含むことおよびその比が約95:5であることがわかった。

実施例4

実施例1でえたPHAをクロロホルムに溶解しガラス板上にキャスト、風乾しフィルム成型した。このフィルム*

*を当研究所庭(防府市鐘紡町4番1号)に埋めて強度、伸度、形態的な経時変化を観察した。結果を表1に示すが、約60日で完全に強度を失うまでに分解することがわかる。また、図5から図8に、それぞれ埋める前、埋めた後8日、30日および60日間経過後のフィルムの状態の電子顕微鏡写真を示す。

【0038】

【表1】

表 1

試 料	経 過 日 数 (日)			
	1	8	30	60
厚 み (mm)	0.087	0.073	0.052	0.041
破断強度 (g)	102.3	58.5	30.1	0.0
破断伸度 (%)	5.9	3.3	2.8	0.0

【0039】

【発明の効果】本発明の分離・精製法により、PHA蓄積菌から、安全に効率よく、純度の高いPHAを分離・精製することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1でえられたポリマーの分子量分布曲線である。

【図2】実施例1でえられたポリマーの熱分析の測定結果を表わすグラフである。

【図3】実施例1でえられたポリマーの¹H-NMRのスペクトル分析の結果を表わすチャートである。 ※

※【図4】実施例1でえられたポリマーの¹³C-NMRスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

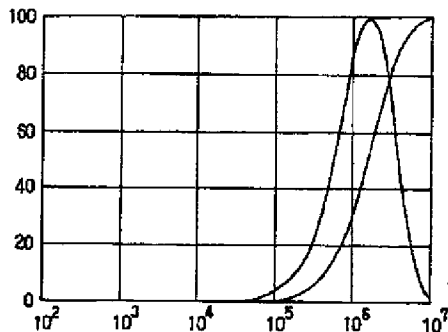
【図5】実施例4の埋める前のフィルムの電子顕微鏡写真(50倍)である。

【図6】実施例4の埋めた後8日間経過後のフィルムの電子顕微鏡写真(50倍)である。

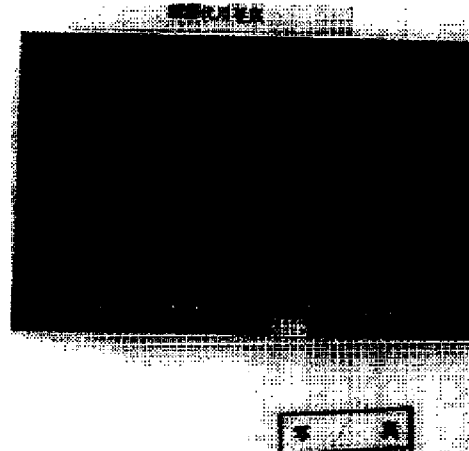
【図7】実施例4の埋めた後30日間経過後のフィルムの電子顕微鏡写真(30倍)である。

30 【図8】実施例4の埋めた後60日間経過後のフィルムの電子顕微鏡写真(30倍)である。

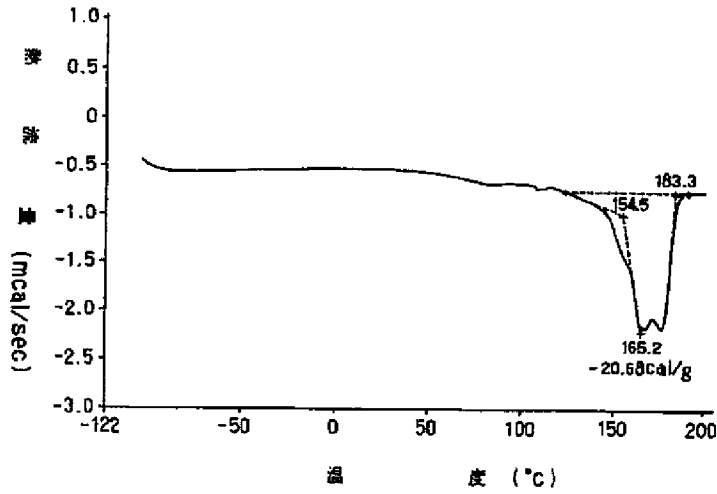
【図1】



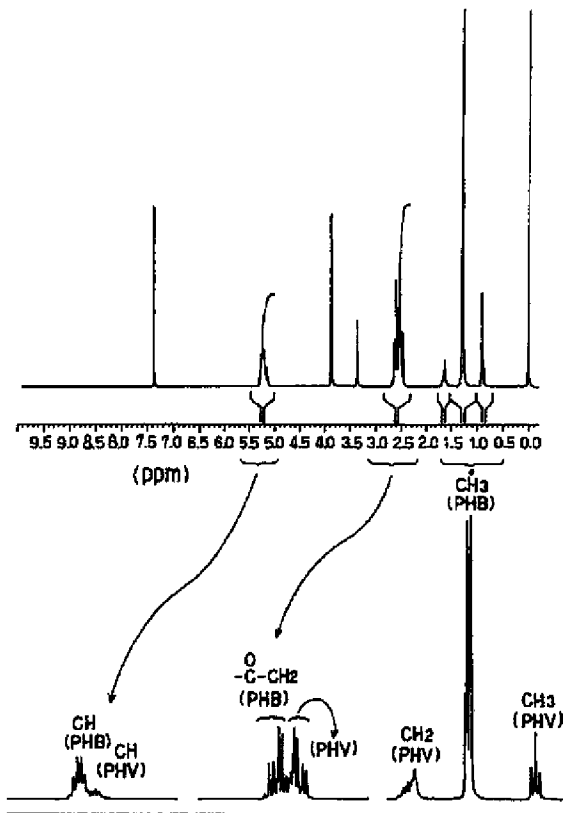
【図5】



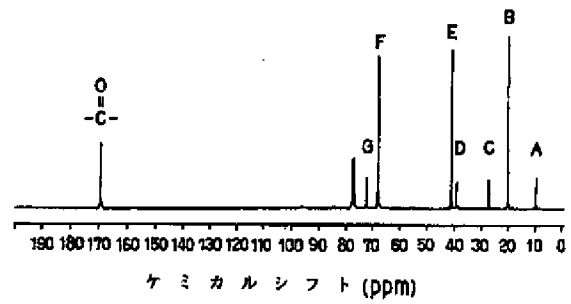
【図2】



【図3】

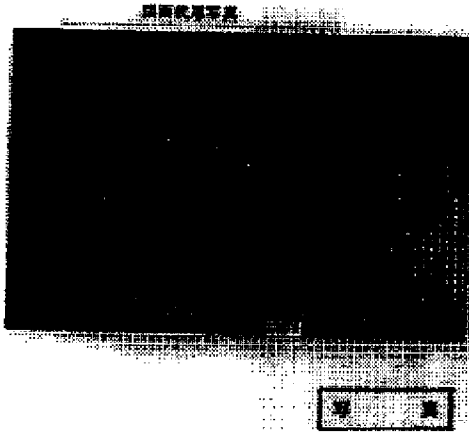


【図4】

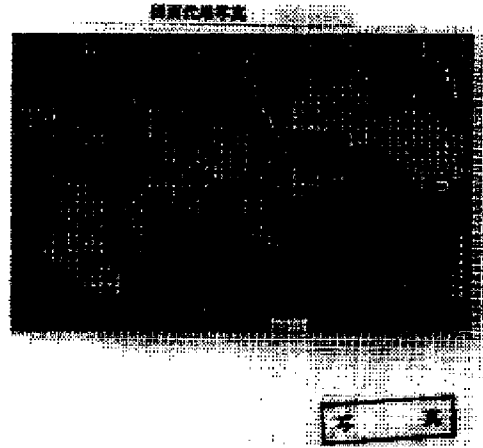


- A CH₃ (PHV)
- B CH₃ (PHB)
- C CH₂ (PHV)
- D $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$ (PHV)
- E CH₂ (PHB)
- F CH (PHB)
- G CH (PHV)

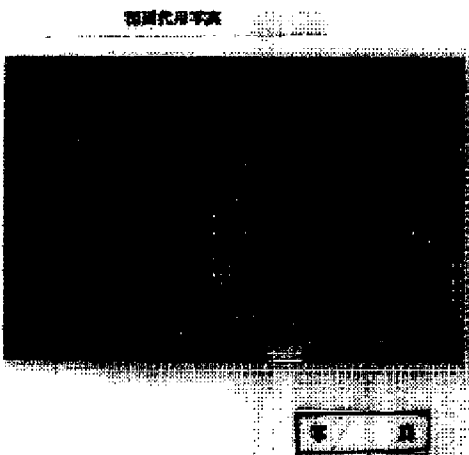
【図6】



【図7】



【図8】



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-336982

(43)Date of publication of application : 21.12.1993

(51)Int.Cl.

C12P 7/62

(21)Application number : 04-353197

(71)Applicant : KANEBO LTD

(22)Date of filing : 11.12.1992

(72)Inventor : MOCHIDA KOICHI
KONDO YOSHIKAZU
MATSUI MASAO
ICHIHASHI KUNIO

(30)Priority

Priority number : 92JP 9200751 Priority date : 11.06.1992 Priority country : WO

(54) METHOD FOR SEPARATING AND PURIFYING POLYHYDROXY ORGANIC ACID ESTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To safely and efficiently obtain the subject biodegradable polymer by adding a lytic enzyme to a suspension of a microbial cell containing an accumulated polyhydroxy organic acid ester, dissolving the cell wall, then separating grains of the accumulated substance covered with a film in the cytoplasm and removing the film with an enzyme.

CONSTITUTION: A microorganism [e.g. *Rhodobacter capsulatus* (ATCC11166)] capable of producing a polyhydroxy organic acid ester is cultured in a culture medium and the resultant microbial cell containing the accumulated polyhydroxy organic acid ester is then suspended in a 0.50mM phosphoric acid buffer solution at pH 7.0. A lytic enzyme such as lysozyme is added and made to react therewith at ambient temperature for 30min to dissolve the cell wall. The obtained suspension is subsequently centrifuged to recover grains of the polyhydroxy organic acid ester, present in the cytoplasm, covered with a granular film and having $\geq 0.1\mu\text{m}$ grain diameter. The grain film is then dissolved and removed by treatment with a proteolytic enzyme such as trypsin and the reactional solution is centrifuged to recover a precipitate. Thereby, the objective high-purity polyhydroxy organic acid ester is safely and efficiently separated.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The particle size 0.1 covered by the granulation coat which is the approach of separating and refining polyhydroxy organic-acid ester from a polyhydroxy organic-acid ester are-recording biomass, and exists after the process which adds lytic enzyme to biomass suspension and dissolves a cell wall, and in cytoplasm Separation and the purification method of the polyhydroxy organic-acid ester characterized by to consist of a process which carries out separation recovery and collects these about the polyhydroxy organic-acid ester granulation more than mum, and a process which remove a granulation coat by proteolytic enzyme processing to the appropriate back

[Translation done.]

* NOTICES *

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damage caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the approach of separating and refining the polyhydroxy organic-acid ester (henceforth PHA) accumulated into the biomass.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is known that PHA is a macromolecule accumulated into a biomass as bacterial energy storage matter. Since PHA is a polymer which has spontaneous decomposition nature, the utilization and application are expected very much these days when the problem of environmental protection attracts attention. However, its separation and purification were problems.

[0003] Conventionally, separation and purification in [PHA] a biomass were performed using chlorine-based organic solvents, such as chloroform and dichloroethane, (for example, refer to JP.61-35790A). However, the viscosity of the solution the amount of solvents needed for an extract is not only very extensive, but extracted is also very large, and separation and purification of the polymer from this solution are difficult. Furthermore, if an example is taken by the effect to toxicity and an environment, the approach using such an organic solvent is not so much desirable. The activity of these organic solvents is actually a direction regulated legally gradually.

[0004] Moreover, although there is also an approach using the dioxane which are organic solvents other than a chlorine system (refer to JP.63-198991A). It is the soluble point of a polymer, and temperature of a dioxane solution must be made into the elevated temperature of 80 degrees or more, and practicability — the point and PHA of workability decompose and deteriorate — is missing.

[0005] As an approach of not using an organic solvent, the approach of a publication is raised to JP.60-145097A. This is the approach of separating the insoluble residue containing PHA, after solubilizing a PHA content biomass with a proteolytic enzyme and/or a surfactant. By such approach, a cell membrane and protein are solubilized in un-choosing by the proteolytic enzyme and/or the surfactant, and the viscosity of PHA content liquid becomes remarkably high.

Therefore, separation / recovery actuation of the PHA granulation from a solution becomes difficult, and separation / recovery actuation of the filtration for impurity clearance, centrifugal separation, etc. also becomes impossible. Moreover, in order to collect PHAs according to centrifugal separation, a flocculant must be added and flocks must be made to form, since PHA is intermingled with cytoplasm and a protein enzymatic hydrolysis object and serves as stable suspension during separation / purification actuation. Since the process of flocculant addition not only increases by this, but components other than PHA will be contained in flocks, it is inconvenient also in respect of a manufacturing cost or the purity of PHA.

[0006] A biomass is changed into spheroplast, by acoustic wave oscillating processing, these are crushed in JP.63-226291A and the method of separating the maximum upper layer (PHA) formed after carrying out centrifugal separation is indicated. By this approach, the viscosity of PHA content liquid rises remarkably too by acoustic wave oscillating processing. Moreover, since PHA which surfaced is separated, the impurity which are PHA and this specific gravity is

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi_ejje

2006/07/21

JP.05-336982A [DETAILED DESCRIPTION]

3/6 ページ

practically. Before performing separation actuation, it is 0.1 by the specimen. It checks that it is more than mum. The magnitude of the PHA granulation accumulated in the microorganism inside of the body is 0.1 as mentioned above. More than mum is desirable and less than 0.1-micrometer granulation may be eliminated in a separation purification process.

[0016] Moreover, although the PHA accumulated dose in a biomass is not limited, either, the approach of this invention is effective especially when the PHA accumulated dose in a biomass is high, and is 80 % of the weight or more preferably.

[0017] Although it digests a cell wall, the lytic enzyme used in this invention is good anything, if theca granulosa is not digested. As such an enzyme, a lysozyme is raised, for example.

[0018] first, the aqueous solution which suspended said biomass — lytic enzyme — 0.1 — 0.5 mg/ml — adding — about [a room temperature and] — pH 5-8.5 It digests about 10 to 80 minutes.

[0019] Separation recovery of the PHA granulation is carried out from the liquid containing the PHA granulation obtained by lytic enzyme processing. Centrifugal separation, filtration, electrophoresis, etc. can perform separation of PHA granulation. When carrying out on a scale of industrial, centrifugal separation or filtration is desirable.

[0020] Although it is desirable to carry out a grade for 2 ~ 15 minutes by abbreviation 9,000 ~ 12,000G (G: gravitational acceleration) as for centrifugal separation when centrifugal separation separates PHA granulation, it should be suitably determined by a configuration, magnitude, etc. of PHA granulation.

[0021] When filtration separates PHA granulation, the micro filter and ultrafiltration membrane which are usually used can be used. For example, the thing which made the specific hole form in films, such as polyethylene, polypropylene and polytetrafluoroethylene, and a polycarbonate, and a membrane is raised. The magnitude of the hole of this filtration membrane is usually at least 0.05 micrometers or more. Also by combining centrifugal separation and filtration, it is efficient or highly precise and can attain.

[0022] By carrying out proteolytic enzyme processing of the PHA granulation separated by making it such, dissolution clearance of the PHA theca granulosa is carried out. Namely, it is 10-100 of pH 5-8 about PHA granulation. It re-suspends in the mM tris-HCl buffer solution or a phosphate buffer solution, and carries out by carrying out 100-1000microg/ml addition, and making a proteolytic enzyme react for 30 ~ 60 minutes at 30-40 degrees C.

[0023] Although especially the proteolytic enzyme used is not limited, pronase, the negarse, BIOPURAZE, a pepsin, a trypsin, etc. are raised, for example.

[0024] Centrifugal etc. separates PHA again after proteolytic enzyme processing. It washes with water after a reaction if needed.

[0025] Although it is also possible to carry out from the solution which distributed granulation as mentioned above, dissolution clearance of PHA theca granulosa can also perform PHA granulation, after fabricating, direct melting and. As a process condition, it is indispensable to carry out below with the decomposition temperature of PHA. It is desirable to form a sintered compact below in the decomposition point preferably, putting a pressure. By processing after shaping, the industrial merit of being easy to collect PHAs, without granulation breaking is during processing. Moreover, molding is carried out to the form where surface area becomes large as much as possible like the shape of a film, a sheet, an accumulation object, or yarn so that proteolytic enzyme processing may be performed easily. By doing so, reduction of the processing time accompanying dissolution processing area buildup is achieved. Thus, add the fabricated PHA granulation to remaining as it is or the buffer solution which carried out beating and dissolved the proteolytic enzyme, it is made to react like the above, and dissolution clearance of the protein is carried out.

[0026] Or after carrying out lytic enzyme processing of the biomass and performing proteolytic enzyme processing previously as mentioned above, it is also possible to separate PHA by the

unremovable.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention aims at suppressing the steep viscosity rise of PHA content liquid, and the process of an excess like addition of a flocculant offering separation and the purification method of PHA with unnecessary high purity in view of this actual condition, not using a harmful organic solvent like the former.

[0008]

[Means for Solving the Problem] This invention is the particle size 0.1 covered by the granulation coat which is the approach of separating and refining a PHA from a PHA are-recording biomass, and exists after the process which adds lytic enzyme to biomass suspension and dissolves a cell wall, and in cytoplasm. It is related with separation and the purification method of the PHA characterized by to consist of a process which carries out separation recovery and collects these about the PHA granulation more than mum, and a process which removes a granulation coat by proteolytic enzyme processing to the appropriate back.

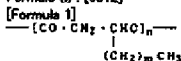
[0009]

[Example] As a result of repeating examination wholeheartedly that said object should be attained, this invention persons are dissolving only a cell wall, without spoiling PHA theca granulosa by using lytic enzyme, and completed a header and this invention for the ability of a membrane component to be easily removed [that it may dissociate from other cell components easily by using PHA as granulation, and] further from PHA granulation.

[0010] PHA separation and the purification method of this invention are explained below.

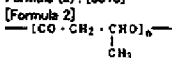
[0011] As long as the PHA are recording biomasses used in this invention are a microorganism belonging to a RODOBAKUTA (Rhodobacter) group, the Alcaligenes (Alcaligenes) group, or a bacillus (Bacillus) group, and other microorganisms which accumulate PHA into a biomass, which biomass is sufficient as them. Here, PHAs are the following formulas (I). It is the polymer or copolymer which is shown and which is accumulated into a biomass.

Formula (I) : [0012]



(m and n express an integer among a formula) He is Poly 3 shown, for example by the following formula (II) as such a PHA. ~ The polymer from which the polymer which consists of a polymer which consists of hydroxybutyric acid ester (henceforth PHB), or PHB serves as a principal component is raised.

Formula (II) : [0013]



(The inside of a formula and n are the same as the above) A with a carbon numbers of five or more organic-acid ester component may also be contained as other components in that case. Furthermore, the polymer which consists of 3-hydroxybutyric acid ester and 3-hydroxy valerate is raised.

[0014] By the microorganism which accumulates such a PHA into a biomass, PHA is wrapped in theca granulosa as granulation, and exists in a biomass. PHA theca granulosa consists of protein, such as PHA synthetic enzyme and a PHA dialytic ferment, and phospholipid of a minute amount, isolates PHA from cytoplasm within a biomass, and is serving to maintain granulation at a stable configuration.

[0015] The particle size of the PHA granulation in a biomass is 0.1. What is necessary is just more than mum, particle size -- 0.1 the case where it is under mum -- separation and recovery -- markedly -- alike -- difficult -- becoming -- 0.1 [and] the molar fraction below mum -- relative -- few -- 0.1 Even if it excepts the PHA granulation below mum, it is satisfactory

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi_ejje

2006/07/21

JP.05-338982A [DETAILED DESCRIPTION]

4/6 ページ

decomposition processing may be performed if needed in the case of bacteriolysis processing. Nucleic-acid decomposition processing is performed by adding nuclease, such as blowout REASU origin deoxyribonuclease I (400 ~ 600 U/mg) of for example, a small cow.

[0028] Moreover, sonication which used sonication and an about 10kHz audible-sound wave after bacteriolysis processing if needed in separation and the purification method of this invention can also be performed. Processing which is extent which PHA granulation itself does not decompose as sonication conditions which used the sonication in this case and an about 10kHz audible-sound wave is performed. Moreover, PHA dispersion liquid are cooled if needed. According to the cases of bacillus, although processing conditions naturally change, 10kHz or more about 1000kHz an acoustic wave or a supersonic wave is used. These frequencies of changing also according to the class of microorganism are arbitrary. Reinforcement is usually 0.05 W/cm2. It is [desirable] 1 ~ 30 W/cm2 preferably to 0.1 ~ 50 W/cm2 and a pan above. It is extent. However, even if it processes using the supersonic wave of quite strong reinforcement (10-30 W/cm2 extent) from the ultrasonic reinforcement (1 W/cm2 extent) usually used for sonication of a biomass, the PHA granulation in a biomass is not destroyed. On the other hand, other biomass components are promptly made detailed (in RODOBAKUTA KYAPUSUREITASU after being processed by the lysozyme according to the approach of this invention, the biomass was made detailed by 20kHz, 20 W/cm2, and the sonication for 5 minutes). Therefore, processing can be managed in a short time and is so efficient that the reinforcement of a supersonic wave is strong.

[0029] PHA refined by the above approaches is obtained.

[0030] Although separation and the purification method of PHA of this invention are explained based on an example below, this invention is not limited only to this example from the first.

Example 1 RODOBAKUTA KYAPUSUREITASU (Rhodobacter capsulatus ATCC 11166) (when a glucose is made into a carbon source) accumulating PHA which is alike and mainly consists of PHB gets to know -- having -- 5g (it was observed that the granulation of particle size 0.4 ~ 0.6 μm is in the 2-3-piece close per biomass) (equivalent to wet bacteria and 1g of dried cells) of PHA are recording biomasses which cultivated the glucose as a carbon source -- pH7.0 -- It suspends in 30ml of 50mM phosphate buffer solutions, and is a lysozyme (the lysozyme chloride (purification) albumen origin), the Nakarai Tesaku make -- 50mg and 1M CaCl2 0.5ml and DNase (the product made from a sigma, Type I) -- 0.5mg In addition, it agitated and was made to react for 30 minutes at a room temperature. Subsequently, 20kHz of sonication under ice-cooling was performed for 10 minutes. Next, centrifugal separation was performed for 30 minutes by 10,000G, and PHA particle fractions were collected. Again, centrifugal separation of the PHA fraction was suspended and carried out to pH8.0 and 50mM phosphate buffer solution, PHA fractions were collected, purification was repeated, and rough PHA(75% of purity)0.52g was obtained. Rough PHA was fused by 150 °, and it fabricated on the film with a thickness of 50 micrometers. This film was ****(ed) to about 1x1mm, it was immersed in pH7.0 and 50mM phosphate buffer solution, pronase 20mg was added, and 80 degrees C was made to react for 6 hours. The film after a reaction was rinsed and it dried (0.8 g).

RODOBAKUTA obtained in the example 2 example 1 It is 100ml (pH8.0) of 50mM tris hydrochloric-acid buffer solutions in 100mg (80% of PHA contents) of lyophilized cells of KYAPUSUREITASU (R. capsulatus ATCC 11166). It suspended and agitated gently for 5 minutes. The diameter of the PHA granulation in a biomass is 0.4-0.8 as a result of a specimen. It turned out that 1 or two pieces exist in 1 biomass by mum. Subsequently, 1M MgCl2 1ml, lysozyme (lysozyme chloride (purification) albumen origin, Nakarai Tesaku make) 50mg, DNA ase (product made from sigma, Type I) 1mg, and 0.1 M EDTA sodium 2ml was added, and was agitated and melted. The container was moved into ice breaking after churning for 30 minutes, and it processed for 2 minutes by 10kHz. It moved to the centrifuging tube, centrifugal separation was carried out on the conditions for 5000G 20 minutes, **** and 10ml (pH8.0) of 50mM tris hydrochloric-acid buffer solutions were added for supernatant liquid, and rough PHA suspension

minutes, 10ml of these buffer solutions was added to **** and PHA which sedimented, and centrifugal separation of the supernatant liquid was carried out the condition for [after churning / 5000] G or 10 minutes. PHA which carried out **** sedimentation of the supernatant liquid was freeze-dried. Yield was 75mg.

In order to check the description of PHA manufactured according to example 3 example 1, thermal analysis (DSC), molecular-weight-distribution measurement (GPC), and measurement (NMR) of a nuclear-magnetic-resonance spectrum were performed.

[0031] A result is indicated to be the condition below.

(1) CHCl₃ after adding 10ml of m-cresol to about 30mg of GPC (≡ liquid) samples and dissolving in them thoroughly at 40 degrees C The scalpel rise was carried out at 50ml, and what was filtered with the 0.45micro needle plan filter was used as the test liquid.

[0032] (Measuring condition)

Pump: GPCD (TOSOH)

Column: GMHXL (TOSOH)

Eluate: m-cresol / CHCl₃ (1:4)

≡ Amount: 1.0 ml/min ≡ Whenever: 40 degrees (thermostat GO-8011 TOSOH)

Det: RI-8010 (TOSOH)

Injection rate: Creating from 50micro (molecular-weight calibration curve) standard polystyrene, molecular weight is reduced property table **** of standard polystyrene molecular weight.

[0033] (Data) A molecular-weight-distribution curve is shown in drawing 1.

[0034] (Join ≡) Mw of PHA of an example 1 is 180 from data. It turned out that 10,000 and Mn are 800,000. Mw/Mn was 2.25.

(2) A DSC measurement result is shown in drawing 2.

[0035] This result showed that Tm of PHA of an example 1 was 185.2 ≡.

(3) The solvent performed NMR using deuteration chloroform, having used the NMR magnetic field as 300MHz.

[0036] About PHA obtained in the example 1 The measurement result of 1 H-NMR was shown in drawing 3, and the measurement result of 13C-NMR was shown in drawing 4.

[0037] The result of NMR showed that PHA obtained in the example 1 including hydroxybutyric acid (PHB) and a hydroxy valeric-acid (PHV) unit and its ratio were about 95.5.

PHA obtained in the example 4 example 1 — chloroform — dissolving — a glass plate top — the cast — it was air-dry and film molding was carried out. This film was buried in this laboratory yard (4-1, Kanebo-cho, Hofu-shu), and reinforcement, ductility, and gestalt-aging were observed. Although a result is shown in a table 1, it turns out that it will decompose by the time it will lose reinforcement thoroughly in about 60 days. Moreover, before burying from drawing 5 to drawing 8, respectively, after burying, the electron microscope photograph of the condition of the film after progress is shown for eight days, 30 days, and 60 days.

[0038]

[A table 1]

表 1

試 料	経 過 日 数 (日)			
	1	8	30	60
厚 み (mm)	0.087	0.073	0.052	0.041
破断強度 (g)	102.3	58.5	30.1	0.0
破断伸度 (%)	5.9	3.3	2.8	0.0

[0039]

[Effect of the Invention] It is possible for it to be safely efficient, to dissociate and to refine PHA with high purity from a PHA are recording bacillus, according to separation and the purification method of this invention.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the molecular-weight-distribution curve of the polymer obtained in the example 1.

[Drawing 2] It is a graph showing the measurement result of the thermal analysis of the polymer obtained in the example 1.

[Drawing 3] Polymer obtained in the example 1 It is a chart showing the result of the analysis of a spectrum of ^1H -NMR.

[Drawing 4] It is a chart showing the result of the ^{13}C -NMR analysis of a spectrum of the polymer obtained in the example 1.

[Drawing 5] It is the electron microscope photograph (50 times) of the film before an example 4 buries.

[Drawing 6] After an example 4 buries, it is the electron microscope photograph (50 times) of the film after progress for eight days.

[Drawing 7] After an example 4 buries, it is the electron microscope photograph (30 times) of the film after progress for 30 days.

[Drawing 8] After an example 4 buries, it is the electron microscope photograph (30 times) of the film after progress for 60 days.

[Translation done.]